



TITLE:

アルツハイマー病脳内タウ凝集体
を標的とした核医学分子イメージ
ングプローブの開発に関する研究(
Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

松村, 憲志

CITATION:

松村, 憲志. アルツハイマー病脳内タウ凝集体を標的とした核医学分子
イメージングプローブの開発に関する研究. 京都大学, 2015, 博士(薬科
学)

ISSUE DATE:

2015-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k18922>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は
2016/03/22に公開; 許諾条件により本文は2018-09-01に公開

京都大学	博士（薬科学）	氏名	松 村 憲 志
論文題目	アルツハイマー病脳内タウ凝集体を標的とした核医学分子イメージングプローブの開発に関する研究		
論文内容の要旨			
<p>現在、アルツハイマー病(AD)はアンメットメディカルニーズの高い代表的疾患のひとつとなっており、その診断法および治療法の開発が強く求められている。</p> <p>AD脳内の病理学的特徴として、アミロイドβ凝集体（Aβ）を主成分とする老人斑と過剰リン酸化タウ凝集体(タウ)を主成分とする神経原線維変化の蓄積が知られている。これら異常蓄積物はAD病態における重要なバイオマーカーであり、これらの生体イメージングから得られる情報はAD診断および治療薬の開発研究に有益であると考えられる。特に、Aβの蓄積はADの最も早期に始まることから、これまでにAβを高感度かつ非侵襲的に体外から検出することのできるpositron emission tomography (PET)やsingle photon emission computed tomography (SPECT)を用いる核医学分子イメージングプローブの開発が活発に行われてきた。しかし、このAβイメージングプローブを用いた臨床試験において、健常高齢者脳内にもAβの蓄積が認められる偽陽性群の存在が多数報告されおり、ADの画像診断を高精度に行うためにはAβイメージングのみでは困難であると認識されつつある。一方、タウの蓄積はAD発症以前より始まり、その蓄積量と臨床症状との間には高い相関性があることが報告されている。したがって、タウの生体イメージングは、Aβイメージングに比べ、ADの早期診断や病状進行の判定に有効であると考えられる。</p> <p>本研究では、脳内に蓄積したタウを体外から非侵襲的に定量イメージングする方法を構築するため、タウに選択的結合性を有する核医学分子イメージングプローブの開発を計画した。</p>			
第1章 タウイメージングプローブとしてのフェニルジアゼニルベンゾチアゾール誘導体に関する検討			
<p>タウイメージングプローブに求められる条件として、①血液脳関門を通過すること、②タウへ選択的に結合すること、③非結合プローブが速やかに脳内から消失することが挙げられる。そこで、これらの条件をもとに、タウ凝集阻害作用を有するフェニルジアゼニルベンゾチアゾール(PDB)を母核として、放射性ヨウ素-125の効率良い導入を考慮したPDB誘導体をタウイメージングプローブとして設計・合成した。合成したPDB誘導体はリコンビナントタウ凝集体に対する結合性を示し、特に、置換基としてジメチルアミノ基を有する(E)-4-((6-iodobenzo[d]thiazol-2-yl)diazenyl)-N,N-dimethylaniline (PDB-3)は、AD患者剖検脳組織切片を用いたin vitroオートラジオグラフィ(ARG)および蛍光染色実験において、Aβへの結合性を示す一方で、脳内に蓄積したタウを明瞭に描出した。さらに、正常マウスを用いた体内放射能分布実験においてPDB-3は脳移行性を示した。以上の結果より、本誘導体がタウイメージングプローブとしての基礎的性質を有することを認めた。</p>			

第2章 タウに対する選択的結合性の向上を目的とした芳香族ヘテロ環含有スチリル誘導体の合成と構造活性相関に関する検討

第1章において、PDB-3はタウに高い結合性を示すとともに、A β にも高い結合性を示したことから、タウイメージングプローブとしてはタウに対するより高い選択的結合性が求められた。そこで、PDB骨格を基盤としてタウへの結合性に関与すると考えられる芳香族ヘテロ環の構造変換を行い、タウ結合性に関する構造活性相関に関する検討を行うことを計画した。すなわち、ベンゾチアゾールをはじめとする5種の異なる芳香族ヘテロ環構造を有するスチリル誘導体を合成し、AD患者剖検脳組織切片を用いたARGを行うことによりタウへの選択的結合性を評価した。また、これまでのA β イメージングプローブの開発研究において、A β との相互作用には分子中のアミノ基が重要であることが示唆されていることから、タウとA β との選択的結合性が向上することを期待してジメチルアミノ基を除いたスチリル誘導体も合成し、比較検討した。その結果、ジメチルアミノ基を有する全てのスチリル誘導体の脳組織切片上における放射能集積は大きく相違することがないことを認めた。一方、ジメチルアミノ基を除いたスチリル誘導体では、含有する芳香族ヘテロ環構造の種類によって脳組織切片上の放射能集積に相違が認められた。特に、ベンゾイミダゾールを母核とした(*E*)-6-iodo-2-styryl-1*H*-benzo[*d*]imidazole (SBI-2)は、脳白質への非特異的結合が認められる一方で、PDB-3に比べてタウへの選択的結合性が向上した。さらに、正常マウスを用いた体内放射能分布実験において、SBI-2は投与早期での高い脳移行性とその後の脳からの速やかな消失を示した。以上の結果より、SBI-2がタウイメージングプローブとして有効である可能性が示唆された。

第3章 ベンゾイミダゾピリジン母核としたタウイメージングプローブの開発

第2章の結果を受けて、より高性能なタウイメージングプローブを開発するためにSBI-2をリード化合物として更なる構造の最適化を行った。すなわち、SBI-2は部分構造であるエテニル基に由来する光異性化が起こることが問題点として考えられたことから、この光安定性を改善するためにエテニル基の部位を環状化させた4種のベンゾイミダゾピリジン(BIP)誘導体を新たに設計・合成した。合成した全てのBIP誘導体において、光安定性が改善されたとともに、SBI-2に比べて白質への非特異的集積の少ない明瞭なタウ描出画像を得ることに成功した。また、いずれのBIP誘導体も正常マウスを用いた体内放射能分布実験において脳移行性を示し、特に、7-iodobenzo[4,5]imidazo[1,2-*a*]pyridine (BIP-3)が最も良好な脳内挙動を示した。以上の結果より、BIP-3はタウイメージングプローブとして有効であることを見出した。

以上、本研究はAD脳内タウを標的とした核医学による生体イメージングに有効な分子プローブの開発に成果を収めたものであり、これらの知見は、ADの早期診断および治療薬の開発研究に有益な情報を提供するものと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

現在、アルツハイマー病(AD)の診断法の開発が強く求められている。そこで、これまでADにおける脳内の代表的な病理学的特徴であるアミロイド β (A β) を主成分とする老人斑を標的とした核医学分子イメージングプローブの開発が活発に行われてきた。しかし、このA β イメージングでは、健常高齢者脳内にもA β の蓄積が認められる偽陽性群の存在が多数あり、ADの画像診断を高精度に行うためにはA β イメージングのみでは困難であると認識されつつあり、ADにおける、もう一つの代表的な脳内の病理学的特徴であるタウ凝集体を標的としたタウイメージングのためのプローブ開発が注目されている。また、タウイメージングは、タウの蓄積がAD発症以前より始まることから、ADの早期診断や病状進行の判定での有効性にも期待が持たれている。そこで本論文では、脳内に蓄積したタウを体外から非侵襲的に定量イメージングする方法を構築するため、タウに選択的結合性を有する核医学分子イメージングプローブの開発を計画したものである。

著者は、先ず、タウ凝集阻害作用を有するフェニルジアゼニルベンゾチアゾール(PDB)を母核とする放射性ヨウ素標識タウイメージングプローブを設計・合成した。それらのPDB誘導体はタウ凝集体に結合性を示したが、特に、置換基としてジメチルアミノ基を有する誘導体が、AD患者剖検脳組織切片を用いた*in vitro*オートラジオグラフィーおよび蛍光染色実験において、脳内に蓄積したタウを明瞭に描出するとともに、マウスに静注後脳移行性を示した。以上の結果より、本誘導体がタウイメージングプローブとしての基礎的性質を有することを見出した。

さらに、タウに対するより高い選択的結合性を求めて、PDB骨格を基盤として芳香族ヘテロ環の構造変換を行い、タウ結合性に関する構造活性相関に関する検討を行った。。すなわち、ベンゾチアゾールをはじめとする5種の異なる芳香族ヘテロ環構造を有するスチリル誘導体を合成し、AD患者剖検脳組織切片を用いたARGを行うことによりタウへの選択的結合性を評価した。また、これまでのA β イメージングプローブの開発研究において、A β との相互作用には分子中のアミノ基が重要であることが示唆されていることから、タウとA β との選択的結合性が向上することを期待してジメチルアミノ基を除いたスチリル誘導体も合成し、比較検討した。

その結果、ジメチルアミノ基を有する全てのスチリル誘導体の脳組織切片上における放射能集積は大きく相違することがないことを認めた。一方、ジメチルアミノ基を除いたスチリル誘導体では、含有する芳香族ヘテロ環構造の種類によって脳組織切片上の放射能集積に相違が認められた。特に、ベンゾイミダゾールを母核とした(*E*)-6-iodo-2-styryl-1*H*-benzo[*d*]imidazole (SBI-2)は、脳白質への非特異的結合が認められる一方で、PDB-3に比べてタウへの選択的結合性が向上した。さらに、正常マウスを用いた体内放射能分布実験において、SBI-2は投与早期での高い脳移行性とその後の脳からの速やかな消失を示した。以上の結果より、SBI-2がタウイメージングプローブとして有効である可能性が示唆された。

第3章 ベンゾイミダゾピリジンをも核としたタウイメージングプローブの開発

第2章の結果を受けて、より高性能なタウイメージングプローブを開発するためにSB I-2をリード化合物として更なる構造の最適化を行った。すなわち、SBI-2は部分構造であるエテニル基に由来する光異性化が起こることが問題点として考えられたことから、この光安定性を改善するためにエテニル基の部位を環状化させた4種のベンゾイミダゾピリジン(BIP)誘導体を新たに設計・合成した。合成した全てのBIP誘導体において、光安定性が改善されたとともに、SBI-2に比べて白質への非特異的集積の少ない明瞭なタウ描出画像を得ることに成功した。また、いずれのBIP誘導体も正常マウスを用いた体内放射能分布実験において脳移行性を示し、特に、7-iodobenzo[4,5]imidazo[1,2-*a*]pyridine (BIP-3)が最も良好な脳内挙動を示した。以上の結果より、BIP-3はタウイメージングプローブとして有効であることを見出した。

以上、本研究はAD脳内タウを標的とした核医学による生体イメージングに有効な分子プローブの開発に成果を収めたものであり、これらの知見は、ADの早期診断および治療薬の開発研究に有益な情報を提供するものと考えられる。

scFv, diabodyなどの低分子化抗体の標的への高い親和性・特異性と抗体より速い体内分布動態に着目して、ファージディスプレイ法により取得したMT1-MMP低分子化抗体に、二官能性キレート試薬*p*-SCN-Bn-DTPAを介し、SPECTでの撮像に適した¹¹¹Inを導入した低分子化抗体プローブ ([¹¹¹In]scFv, [¹¹¹In]diabody) を設計・合成した。得られた低分子化抗体プローブについて、MT1-MMP発現がん細胞移植マウスでの体内動態を調べた結果、両プローブは投与後早期より腫瘍へ集積し、かつ抗体プローブより高い腫瘍対血液放射能集積比を示した。さらにSPECT撮像において、投与3時間後より腫瘍が描出でき、また腫瘍内の放射能分布はMT1-MMP免疫染色によるMT1-MMP発現陽性部位と一致する傾向を示した。以上より、 [¹¹¹In]scFv、 [¹¹¹In]diabodyは投与後早期でのMT1-MMPの発現量評価を可能とする核医学イメージングプローブとなり得ることを見出した。さらに、高い生物活性、速やかな体内動態、高い比放射能が期待できるペプチドプローブの特性に着目し、安定性向上、親和性保持を考慮して、C末に標識用Cys残基を導入した*N*-(*m*-[¹²³I]iodophenyl) maleimide 結合D体ペプチド誘導体 ([¹²³I]I-DC)を設計、合成した。得られたペプチドプローブは、低分子化抗体プローブの5,000倍以上の比放射能、MT1-MMPへの親和性、担がんマウスでの体内動態で投与後早期からの腫瘍集積、投与30分後での明瞭な腫瘍SPECT像、MT1-MMP発現陽性部位と一致する腫瘍内の放射能分布を示すことを認め、本化合物が発現量評価を可能とする核医学イメージングプローブとなり得ることを見出した。

さらに、MT1-MMPの活性評価を目的としたプローブの開発を目的として、MT1-MMP基質ペプチドに、ポリエチレングリコール (PEG) と¹⁸F標識蛍光団 ([¹⁸F]BODIPY) を結合させ、がん組織においてMT1-MMPによる基質ペプチドの切断によりPEGが離脱すると、その高い細胞膜透過性により [¹⁸F]BODIPY部が近傍がん細胞に効率的に取り込まれることを期待した活性化型プローブ ([¹⁸F]MBP-2k) を設計、合成した。得られた [¹⁸F]MBP-2kは、MT1-MMP発現細胞に非発現細胞より高く

取り込まれ、また、MT1-MMP担がんモデルマウスでの体内分布実験の結果、 $[^{18}\text{F}]\text{MBP-2k}$ はMT1-MMP陽性腫瘍へより高く集積し、投与2時間後でのPET撮像によりその陽性腫瘍の描出が可能であった。以上より、 $[^{18}\text{F}]\text{MBP-2k}$ はMT1-MMPの活性評価を可能とする核医学イメージングプローブとなり得ることを見出した。

以上、本研究はMT1-MMPの発現量および酵素活性のインビボ解析によりがんの悪性度診断への貢献が期待される核医学イメージングプローブの開発に基礎的な成果を収めたものであり、これらの知見は、今後のがんの病態評価、医薬品開発、基礎研究に有益な情報を提供するものと評価される。

よって本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成27年2月25日、論文内容とそれに関連した事項について諮問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当分の間当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 年 月 日以降